Notice QuantiFERON®-TB Gold (QFT®) ELISA

2 x 96 (n° de référence 0594-0201)

20 x 96 (n° de référence 0594-0501)

Test de sang total IFN-γ mesurant les réponses aux antigènes peptidiques ESAT-6, CFP-10 et TB7.7(p4)

IVD Utilisation prévue pour le diagnostic in vitro

CE

REF 0594-0201, 0594-0501

Cellestis, a QIAGEN Company
Level 2, Office Tower 2, Chadstone Centre
1341 Dandenong Road, Chadstone, Victoria, 3148 Australie
Téléphone : (Australie) +613-9840-9800

EC REP QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1
40724 Hilden, ALLEMAGNE

1075115FR Rév. 01

www.QuantiFERON.com



Sommaire

1. Utilisation prévue **4**
2. Résumé et explication du test **4**
Principes du test 5
Temps requis pour effectuer le test 5
3. Composants et stockage **6**
Matériel nécessaire mais non fourni 7
Stockage et manipulation 7
4. Avertissements et précautions **8**
Utilisation prévue pour le diagnostic in vitro 8
Avertissements 8
Précautions 9
5. Prélèvement et manipulation des échantillons **11**
6. Instructions d'utilisation **13**
Étape 1 — Incubation du sang et prélèvement du plasma 13
Étape 2 — IFN-γ humain ELISA 14
7. Calculs et interprétation du test **19**
Génération de la courbe de standard 19
Contrôle qualité du test 19
8. Limitations **21**
9. Caractéristiques des performances **22**
Études cliniques 22
10. Informations techniques **24**
Résultats indéterminés 24
Échantillons de plasma coagulé 24
Guide de dépannage 25
11. Bibliographie **27**
12. Service technique **29**
13. Résumé de la procédure du test **30**
Étape 1 — Incubation du sang 30
Étape 2 — IFN-γ ELISA 30
Changements significatifs 32

1. Utilisation prévue

QuantiFERON-TB Gold (QFT®) est un test de diagnostic in vitro qui utilise un cocktail peptidique pour simuler les protéines ESAT-6, CFP-10 et TB7.7(p4) dans le sang total héparinisé. La détection de l'interféron-γ (IFN-γ) par le dosage d'immunoabsorption par enzyme liée (ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay) est utilisée pour identifier les réponses in vitro aux antigènes peptidiques associés à l'infection par *Mycobacterium tuberculosis*.

QFT est un test indirect de recherche de l'infection par *M. tuberculosis* (y compris de la maladie) destiné à être utilisé en combinaison avec une évaluation des risques, des examens radiographiques ainsi que d'autres évaluations médicales et diagnostiques.

2. Résumé et explication du test

La tuberculose est une maladie contagieuse provoquée par une infection par les organismes complexes *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*) qui se propagent généralement à de nouveaux hôtes via des noyaux de gouttelettes transmis par voie respiratoire par les patients atteints de tuberculose respiratoire. Un individu nouvellement infecté peut tomber malade en l'espace de quelques semaines à quelques mois, mais la plupart des individus infectés restent en bonne santé. L'infection tuberculeuse latente (LTBI), un trouble asymptomatique non contagieux, persiste chez certaines personnes, qui peuvent développer une tuberculose quelques mois ou quelques années plus tard. Le principal objectif du diagnostic de la LTBI est d'envisager un traitement médical pour prévenir la tuberculose. Le test cutané tuberculinique (TCT) était jusqu'à récemment la seule méthode disponible de diagnostic de la LTBI. La sensibilité cutanée à la tuberculine se développe de 2 à 10 semaines après l'infection. Toutefois, certains individus infectés ne répondent pas à la tuberculine, notamment ceux souffrant d'une variété de troubles bloquant les fonctions immunitaires, mais aussi d'autres ne souffrant pas de ces problèmes. À l'inverse, certains individus ayant peu de risques de présenter une infection par *M. tuberculosis* montrent une sensibilité à la tuberculine et présentent des résultats positifs au TCT après vaccination par le bacille Calmette-Guérin (BCG), après une infection par mycobactérie autre que le complexe *M. tuberculosis* ou en raison d'autres facteurs indéterminés.

Il faut distinguer la LTBI de la tuberculose, un trouble à déclaration obligatoire qui affecte généralement les poumons et les voies respiratoires inférieures, même si d'autres systèmes organiques peuvent aussi être touchés. La tuberculose est diagnostiquée à partir de résultats historiques, physiques, radiologiques, histologiques et mycobactériologiques.

QFT est un test recherchant des réponses immunitaires à médiation cellulaire (CMI) aux antigènes peptidiques qui simulent les protéines mycobactériennes. Ces protéines, ESAT-6, CFP-10 et TB7.7(p4), sont absentes de toutes les souches BCG et de la plupart des mycobactéries non tuberculeuses à l'exception de *M. kansasii*, *M. szulgai* et *M. marinum*.(1) Les individus infectés par les organismes complexes *M. tuberculosis* présentent généralement des lymphocytes dans leur sang qui reconnaissent ceux-ci ainsi que d'autres antigènes mycobactériens. Ce processus de reconnaissance implique la génération et la sécrétion de la cytokine IFN-γ. La détection puis la quantification d'IFN-γ constituent la base de ce test.

Les antigènes utilisés dans QFT forment un cocktail peptidique qui simule les protéines ESAT-6, CFP-10 et TB7.7(p4). De nombreuses études ont montré que ces antigènes peptidiques stimulaient les réponses IFN-γ dans les cellules T des individus infectés par *M. tuberculosis*, mais généralement pas chez les personnes non infectées ou vaccinées par le BCG sans maladie ni risque pour la LTBI.(1–32) Toutefois, les traitements médicaux ou les troubles empêchant la fonction immunitaire peuvent réduire

les réponses IFN-γ. Les patients souffrant de certaines autres infections mycobactériennes peuvent aussi répondre à ESAT-6, CFP-10 et TB7.7(p4) car les gènes codant ces protéines sont présents dans *M. kansasii*, *M. szulgai* et *M. marinum*.(1, 23) Le test QFT est à la fois un test de LTBI et un outil utile permettant de diagnostiquer l'infection complexe *M. tuberculosis* chez les patients malades. Un résultat positif étaie le diagnostic de tuberculose, mais des infections par d'autres mycobactéries (p. ex. *M. kansasii*) peuvent aussi entraîner des résultats positifs. D'autres évaluations médicales et diagnostiques sont nécessaires pour confirmer ou exclure la tuberculose.

Principes du test

Le système QFT emploie des tubes spéciaux de prélèvement sanguin qui sont utilisés pour prélever le sang total. L'incubation du sang est réalisée dans les tubes pendant 16 à 24 heures avant que le plasma soit prélevé et testé à la recherche d'IFN-γ produit en réponse aux antigènes peptidiques.

Le test QFT est effectué en deux étapes. Dans un premier temps, le sang total est prélevé dans chacun des tubes de prélèvement sanguin QFT, qui incluent un tube de valeur zéro, un tube antigène TB et un tube mitogène.

Le tube mitogène peut être utilisé avec le tube QFT comme contrôle positif, en particulier en cas de doute sur le statut immunitaire de l'individu. Le tube mitogène peut aussi servir de contrôle pour la bonne manipulation et la bonne incubation du sang.

Les tubes doivent être incubés à 37 °C dès que possible et dans les 16 heures suivant le prélèvement. Après une période d'incubation de 16 à 24 heures, les tubes sont centrifugés, le plasma est retiré et la quantité de IFN-γ (UI/ml) est mesurée par ELISA.

Un test est considéré positif en cas de réponse IFN-γ au tube antigène TB nettement supérieure à la valeur en UI/ml de la valeur zéro d'IFN-γ. Si utilisé, l'échantillon de plasma du tube mitogène sert de contrôle positif IFN-γ pour chaque échantillon testé. Une faible réponse au mitogène (< 0,5 UI/ml) indique un résultat indéterminé lorsqu'un échantillon sanguin présente aussi un résultat négatif aux antigènes TB. Cela peut survenir en cas de lymphocytes insuffisants, d'une activité lymphocytaire réduite en raison d'une mauvaise manipulation de l'échantillon, d'un remplissage/mélange incorrect du tube mitogène ou de l'incapacité des lymphocytes du patient à générer IFN-γ. L'échantillon de valeur zéro corrige le fond, les effets d'anticorps hétérophiles ou l'IFN-γ non spécifique dans les échantillons sanguins. Le niveau IFN-γ du tube de valeur zéro est soustrait du niveau IFN-γ pour le tube antigène TB et le tube mitogène (s'ils ont été utilisés).

Temps requis pour effectuer le test

Le temps requis pour effectuer le test QFT est estimé ci-dessous ; le temps requis pour tester plusieurs échantillons en lots est aussi indiqué :

Incubation à 37 °C des tubes de sang :	16 à 24 heures
ELISA :	environ 3 heures pour une microplaque ELISA
	(28 à 44 individus)
	< 1 heure de travail
	Ajouter 10 à 15 minutes pour chaque microplaque supplémentaire

3. Composants et stockage

Blood Collection Tubes (tubes de prélèvement sanguin)*	**300 tubes**	**200 tubes**	**100 tubes**
N° de référence	**T0590-0301**	**0590-0201**	**T0593-0201**
Nombre de préparations	**100**	**100**	**100**
QuantiFERON Nil Tube (tube de valeur zéro) (bouchon gris, anneau blanc)	100 tubes	100 tubes	
QuantiFERON TB Antigen Tube (tube antigène TB) (bouchon rouge, anneau blanc)	100 tubes	100 tubes	
QuantiFERON Mitogen Tube (tube mitogène) (bouchon violet, anneau blanc)	100 tubes		100 tubes
Notice des tubes de prélèvement QFT	1	1	1
High Altitude (HA) Blood Collection Tubes (tubes de prélèvement sanguin haute altitude) (à utiliser entre 1 020 et 1 875 mètres)*	**300 tubes**	**100 tubes**	**100 tubes**
N° de référence	**T0590-0505**	**0590-0501**	**T0593-0501**
QuantiFERON HA Nil Tube (tube de valeur zéro) (bouchon gris, anneau jaune)	100 tubes	100 tubes	
QuantiFERON HA TB Antigen Tube (tube antigène TB) (bouchon rouge, anneau jaune)	100 tubes	100 tubes	
QuantiFERON HA Mitogen Tube (tube mitogène) (bouchon violet, anneau jaune)	100 tubes		100 tubes
Notice des tubes de prélèvement QFT	1	1	1

* Toutes les configurations de produits ne sont pas disponibles dans chaque pays. Veuillez vous adresser au service client QIAGEN (coordonnées sur www.qiagen.com) pour de plus amples informations sur les configurations disponibles à la commande.

Composants ELISA N° de référence	Kit 2 plaques ELISA 0594-0201	Pack de laboratoire de référence 0594-0501
Bandelettes pour microplaques (12 x 8 puits) enduites d'anticorps monoclonaux IFN-γ murins anti-humains	2 jeux de bandelettes pour microplaques 12 x 8 puits	20 jeux de bandelettes pour microplaques 12 x 8 puits
Human IFN-γ Standard, lyophilized (standard humain IFN-γ, lyophilisé) (contient de l'IFN-γ humain recombinant, de la caséine bovine, du thimérosal 0,01 % m/v)	1 x flacon (8 UI/ml si reconstitué)	10 x flacons (8 UI/ml si reconstitué)
Green Diluent (diluant vert) (contient de la caséine bovine, du sérum normal de souris, du thimérosal 0,01 % m/v)	1 x 30 ml	10 x 30 ml
Conjugate 100X Concentrate, lyophilized (concentré de conjugué 100X, lyophilisé) (IFN-γ HRP murin anti-humain, contient du thimérosal 0,01 % m/v)	1 x 0,3 ml (si reconstitué)	10 x 0,3 ml (si reconstitué)
Wash Buffer 20X Concentrate (concentré de tampon de lavage 20X) (pH 7,2, contient du ProClin® 300 0,05 % v/v)	1 x 100 ml	10 x 100 ml
Enzyme Substrate Solution (solution de substrat d'enzyme) (contient du H_2O_2, 3,3', 5,5' tétraméthylbenzidine)	1 x 30 ml	10 x 30 ml
Enzyme Stopping Solution (solution de blocage d'enzyme) (contient 0,5M H_2SO_4)†	1 x 15 ml	10 x 15 ml
Notice QFT ELISA	1	1

† Contient de l'acide sulfurique. Voir page 9 pour les précautions d'emploi.

Matériel nécessaire mais non fourni

- Incubateur à 37 °C. CO_2 non requis
- Pipettes à volume variable calibrées de 10 µl à 1 000 µl avec embouts jetables
- Pipettes multicanaux calibrées à 50 µl et 100 µl avec embouts jetables
- Agitateur de microplaque
- Eau déionisée ou distillée, 2 litres
- Laveur de microplaque (laveur automatique recommandé)
- Laveur de microplaque équipé d'un filtre de 450 nm et d'un filtre de référence de 620 nm à 650 nm

Stockage et manipulation

Tubes de prélèvement sanguin

- Stocker les tubes de prélèvement sanguin entre 4 °C et 25 °C.

Réactifs de kit

- Stocker les réactifs de kit au réfrigérateur entre 2 °C et 8 °C.
- Toujours protéger la solution de substrat d'enzyme de la lumière directe du soleil.

Réactifs reconstitués et inutilisés

Pour des instructions sur la reconstitution des réactifs, voir la section 6 (page 14).

- Le standard de kit reconstitué peut être conservé jusqu'à 3 mois s'il est stocké entre 2 °C et 8 °C.

  Noter la date à laquelle le standard de kit a été reconstitué.
- Une fois reconstitué, le concentré conjugué 100X inutilisé doit être stocké entre 2 °C et 8 °C et utilisé dans les 3 mois.

  Noter la date à la laquelle le conjugué a été reconstitué.
- Le conjugué concentré prêt à l'emploi doit être utilisé dans les 6 heures suivant sa préparation.
- Le tampon de lavage concentré prêt à l'emploi peut être stocké à température ambiante jusqu'à 2 semaines.

4. Avertissements et précautions

Utilisation prévue pour le diagnostic in vitro

Avertissements

- Un résultat QFT négatif n'exclut pas le risque d'infection par *M. tuberculosis* ou de tuberculose : les résultats faux négatifs peuvent être dus à l'étape de l'infection (p. ex. échantillon obtenu avant le développement de la réponse immunitaire cellulaire), à des troubles comorbides qui affectent les fonctions immunitaires, à une mauvaise manipulation des tubes de prélèvement sanguin après la ponction veineuse, à une mauvaise exécution du test ou à d'autres variables immunologiques.
- Un résultat QFT positif ne doit pas constituer la base unique ou définitive de la détermination d'une infection par *M. tuberculosis*. Une mauvaise exécution du test peut entraîner des faux positifs.
- Un résultat QFT positif doit être suivi d'autres évaluations médicales et diagnostiques de la tuberculose active (p. ex. frottis et culture du BAAR, radiographie du thorax).
- Si ESAT-6, CFP-10 et TB7.7(p4) sont absents de toutes les souches BCG et de la plupart des mycobactéries non tuberculeuses connues, il est possible qu'un résultat QFT positif soit dû à une infection par *M. kansasii*, *M. szulgai* ou *M. marinum*. Si l'on suspecte de telles infections, d'autres tests doivent être effectués.

Précautions

Utilisation prévue uniquement pour le diagnostic in vitro.

Lors de la manipulation des produits chimiques, toujours porter une blouse de laboratoire, des gants jetables et des lunettes de protection adéquats. Pour plus d'informations, consulter les fiches de données de sécurité (FDS) appropriées. Celles-ci sont disponibles en ligne dans un format PDF pratique et compact sur le site www.qiagen.com/safety répertoriant les FDS imprimables pour chaque kit QIAGEN et chaque composant.

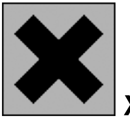


AVERTISSEMENT : le sang humain doit être manipulé comme s'il était potentiellement infectieux.

Observer les directives correspondantes de manipulation du sang.

Les déclarations de risque et de sécurité suivantes s'appliquent aux composants du QuantiFERON-TB Gold ELISA.

Solution de blocage d'enzyme QuantiFERON



Xi

Contient de l'acide sulfurique : irritant. Déclarations de risque et de sécurité :* R36/38, S26-36/37/39

- Le **diluant vert** contient du sérum et de la caséine normale de souris, ce qui peut entraîner des réactions allergiques ; éviter le contact avec la peau.

En cas d'urgence chimique

Renversement, fuite, exposition ou accident

Appeler CHEMTREC nuit et jour

Aux États-Unis et au Canada : 1-800-424-9300

Hors des États-Unis et du Canada : +1-703-527-3887 (appels à frais virés acceptés)

Autres informations

Fiches de données de sécurité : www.qiagen.com/safety

- Toute variation de la *notice QuantiFERON-TB Gold (QFT) ELISA* peut entraîner des résultats erronés. Lire attentivement les instructions avant toute utilisation.
- Ne pas utiliser le kit si un flacon de réactif présente des signes d'endommagement ou de fuite avant son utilisation.

* R36/38 : irritant pour les yeux et la peau ; S26 : en cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste ; S36/37/39 : porter des vêtements de protection et des gants adaptés ainsi qu'une protection pour les yeux/le visage.

- Ne pas mélanger ou utiliser les bandelettes pour microplaque, le contrôle IFN-γ humain, le diluant vert ou le concentré conjugué 100X de différents lots de kit QFT. Les autres réactifs (concentré de tampon de lavage 20X, solution de substrat d'enzyme et solution de blocage d'enzyme) peuvent être interchangés entre les kits si les réactifs ne sont pas périmés et si les détails du lot sont enregistrés. Éliminer les réactifs inutilisés et échantillons biologiques conformément aux réglementations locales, régionales et nationales.
- Ne pas utiliser les tubes de prélèvement sanguin ou le kit ELISA après la date d'expiration.
- S'assurer que l'équipement de laboratoire tel que les laveurs et lecteurs de microplaque ont été calibrés/validés pour utilisation.

5. Prélèvement et manipulation des échantillons

QFT utilise les tubes de prélèvement suivants :

1. Tubes de valeur zéro QuantiFERON (bouchon gris avec anneau blanc ; à utiliser entre le niveau de la mer et 810 m d'altitude)
2. Tubes antigènes TB QuantiFERON (bouchon rouge avec anneau blanc ; à utiliser entre le niveau de la mer et 810 m d'altitude)
3. Tubes mitogènes QuantiFERON (bouchon violet avec anneau blanc ; à utiliser entre le niveau de la mer et 810 m d'altitude)

Tubes haute altitude (HA) :

4. Tubes de valeur zéro HA QuantiFERON (bouchon gris avec anneau jaune ; à utiliser entre 1 020 et 1 875 m d'altitude)
5. Tubes antigènes TB HA QuantiFERON (bouchon rouge avec anneau jaune ; à utiliser entre 1 020 et 1 875 m d'altitude)
6. Tubes mitogènes HA QuantiFERON (bouchon violet avec anneau jaune ; à utiliser entre 1 020 et 1 875 m d'altitude)

Les antigènes ont été séchés sur la paroi interne des tubes de prélèvement sanguin ; il est donc essentiel que le contenu des tubes soit soigneusement mélangé avec le sang. Les tubes doivent être transférés dans un incubateur à 37 °C dès que possible et dans les 16 heures suivant le prélèvement.

Pour des résultats optimaux, respecter les procédures suivantes :

1. **Pour chaque sujet, prélever 1 ml de sang par ponction veineuse directement dans chaque tube de prélèvement sanguin QFT. Cette procédure doit être effectuée par un phlébotomiste expérimenté.**
   - Les tubes de prélèvement sanguin QFT standard peuvent être utilisés à une altitude allant jusqu'à 810 mètres. Les tubes de prélèvement sanguin haute altitude (HA) QFT peuvent être utilisés à une altitude de 1 020 à 1 875 mètres.
   - En cas d'utilisation des tubes de prélèvement sanguin QFT en dehors de ces intervalles d'altitude ou en cas de faible volume de sang, le sang peut être prélevé à l'aide d'une seringue avant d'en transférer immédiatement 1 ml dans chacun des trois tubes. Pour des raisons de sécurité, la meilleure méthode consiste à retirer l'aiguille de la seringue en respectant les procédures de sécurité adéquates, à retirer les bouchons des 3 tubes QFT et à ajouter 1 ml de sang dans chacun des tubes (jusqu'à la marque noire située sur le côté de l'étiquette du tube). Replacer correctement les bouchons et mélanger comme décrit ci-dessous.
   - Comme le prélèvement sanguin pour des tubes de 1 ml est relativement lent, conserver le tube sur l'aiguille pendant 2 à 3 secondes une fois qu'il semble s'être rempli à la hauteur souhaitée afin de s'assurer que le bon volume est prélevé.

     La marque noire située sur le côté des tubes indique un volume de remplissage à 1 ml. Les tubes de prélèvement sanguin QFT ont été validés pour des volumes allant de 0,8 à 1,2 ml. Si le niveau de sang d'un tube ne se rapproche pas de la ligne d'indication, il est recommandé d'obtenir un nouvel échantillon sanguin.

- Si une aiguille « papillon » est utilisée pour le prélèvement sanguin, un tube de purge doit être utilisé pour veiller à ce que la tubulure soit remplie de sang avant que les tubes QFT ne soient employés.
- Le sang peut aussi être prélevé dans un seul tube de prélèvement sanguin générique contenant de l'héparine de lithium comme anticoagulant avant d'être transféré vers les tubes QFT. **Utiliser uniquement l'héparine de lithium** comme anticoagulant car les autres anticoagulants peuvent interférer avec le test. Remplir un tube de prélèvement sanguin (volume minimal 5 ml) et mélanger doucement en retournant le tube plusieurs fois pour dissoudre l'héparine. Le sang doit rester à température ambiante (22 °C ± 5 °C) avant d'être transféré dans les tubes QFT pour incubation, qui doit **impérativement** être lancée dans les 16 heures suivant le prélèvement sanguin.

2. **Immédiatement après avoir rempli les tubes, les secouer dix (10) fois suffisamment fort pour s'assurer que toute la paroi interne du tube est tapissée de sang, et ce, afin de dissoudre les antigènes présents sur les parois du tube.**
   - Les tubes doivent être à une température de 17 °C à 25 °C au moment du remplissage.
   - Le secouement trop énergique des tubes peut provoquer une perturbation du gel et peut entraîner des résultats aberrants.
   - Si le sang a été prélevé dans le tube hépariné, les échantillons doivent être mélangés de manière homogène avant d'être répartis dans les tubes QFT. S'assurer que le sang est bien mélangé en retournant doucement le tube **juste avant de répartir les échantillons**. Déposer des aliquots d'1,0 ml (un par tube QFT) dans les tubes correspondants de valeur zéro, antigène TB et mitogène. La meilleure méthode, à réaliser dans des conditions d'asepsie **en respectant les procédures de sécurité adéquates**, consiste à retirer les bouchons des trois tubes QFT et à ajouter 1 ml de sang dans chacun des tubes (jusqu'à la marque noire située sur le côté de l'étiquette du tube). Replacer correctement les bouchons des tubes et mélanger comme décrit ci-dessus.
3. **Étiqueter correctement les tubes.**
   - Veiller à ce que chaque tube (valeur zéro, antigène TB, mitogène) soit identifiable par son étiquette ou par d'autres moyens une fois que le bouchon est retiré.
4. **Après les avoir remplis, secoués et étiquetés, les tubes doivent être transférés dans un incubateur à 37 °C ± 1 °C dès que possible et dans les 16 heures suivant le prélèvement. Avant l'incubation, maintenir les tubes à température ambiante (22 °C ± 5 °C). Ne pas réfrigérer ou congeler les échantillons sanguins.**

6. Instructions d'utilisation

Étape 1 — Incubation du sang et prélèvement du plasma

Matériel fourni

- Tubes de prélèvement sanguin QFT (se reporter à la section 3).

Matériel nécessaire (mais non fourni)

- Voir la section 3.

Procédure

1. **Si le sang n'est pas incubé immédiatement après avoir été prélevé, le nouveau mélange des tubes en les retournant 10 fois doit être effectué juste avant l'incubation.**
2. **Incuber les tubes DEBOUT à 37 °C ± 1 °C pendant 16 à 24 heures. L'incubateur ne nécessite pas de CO_2 ou d'humidification.**
3. **Après une incubation à 37 °C, les tubes de prélèvement sanguin peuvent rester entre 4 °C et 27 °C jusqu'à 3 jours avant d'être centrifugés.**
4. **Après l'incubation des tubes à 37 °C, le prélèvement du plasma est facilité si les tubes sont centrifugés pendant 15 minutes de 2 000 à 3 000 FCR (g). Le module de gel séparera les cellules du plasma. Si ce n'est pas le cas, les tubes doivent être recentrifugés à une vitesse plus élevée.**
   - Il est possible de prélever le plasma sans centrifugation, mais il faudra faire particulièrement attention à le retirer sans perturber les cellules.
5. **Les échantillons de plasma doivent être prélevés uniquement à l'aide d'une pipette.**
   - **Après la centrifugation, éviter le pipetage répété ou le mélange du plasma par d'autres moyens avant de le prélever. Prendre garde à ne pas perturber la matière sur la surface du gel, quelle que soit l'étape.**
   - Les échantillons de plasma peuvent être chargés directement depuis les tubes de prélèvement sanguin centrifugés vers la microplaque QFT ELISA, y compris lorsque des stations de travail ELISA automatiques sont utilisées.
   - Les échantillons de plasma peuvent être stockés jusqu'à 28 jours entre 2 °C et 8 °C ou, s'ils sont prélevés, au-dessous de -20 °C pendant des périodes prolongées.
   - Pour des échantillons de test corrects, prélever au moins 150 µl de plasma.

Étape 2 — IFN-γ humain ELISA

Matériel fourni

- Kit QFT ELISA (voir la section 3).

Matériel nécessaire (mais non fourni)

- Voir la section 3.

Procédure

1. **Tous les échantillons de plasma et réactifs (sauf le concentré de conjugué 100X) doivent être ramenés à température ambiante (22 °C ± 5 °C) avant d'être utilisés. Attendre au moins 60 minutes pour l'équilibration.**
2. **Retirer du cadre les bandelettes superflues, les resceller dans la poche en aluminium et les replacer au réfrigérateur pour stocker jusqu'à leur utilisation.**

   Prévoir au moins une bandelette pour les standards QFT et suffisamment de bandelettes pour le nombre de sujets testés (voir les figures 2A et 2B pour les formats respectifs à 3 tubes et à 2 tubes). Après utilisation, conserver le cadre et le couvercle pour un emploi ultérieur avec les bandelettes restantes.
3. **Reconstituer le standard lyophilisé du kit avec le volume d'eau déionisée ou distillée indiqué sur l'étiquette du flacon du standard. Mélanger doucement pour réduire la formation de mousse et pour garantir une solubilisation complète. La reconstitution du standard au volume indiqué produira une solution à une concentration de 8,0 UI/ml.**

   Remarque : le volume de reconstitution du standard du kit diffère selon les lots.

   Utiliser le standard du kit reconstitué pour produire une série de dilution à 1 pour 4 de l'IFN-γ dans le diluant vert (DV) (voir figure 1). Le S1 (standard 1) contient 4 UI/ml, le S2 (standard 2) contient 1 UI/ml, le S3 (standard 3) contient 0,25 UI/ml et le S4 (standard 4) contient 0 UI/ml (DV seul). Les standards doivent être testés au moins en duplicats.

Procédure recommandée pour les standards dupliqués	Procédure recommandée pour les standards tripliqués
a. Étiqueter les 4 tubes « S1 », « S2 », « S3 », « S4 ».	a. Étiqueter les 4 tubes « S1 », « S2 », « S3 », « S4 ».
b. Ajouter **150 µl** de DV à S1, S2, S3, S4.	b. Ajouter **150 µl** de DV à S1.
c. Ajouter **150 µl** du standard du kit à S1 et mélanger soigneusement.	b. Ajouter **210 µl** de DV à S2, S3, S4.
d. Transférer **50 µl** de S1 à S2 et mélanger soigneusement.	d. Ajouter **150 µl** du standard du kit à S1 et mélanger soigneusement.
e. Transférer **50 µl** de S2 à S3 et mélanger soigneusement.	e. Transférer **70 µl** de S1 à S2 et mélanger soigneusement.
f. **Le DV seul** sert de standard zéro (S4).	f. Transférer **70 µl** de S2 à S3 et mélanger soigneusement.
	g. **Le DV seul** sert de standard zéro (S4).

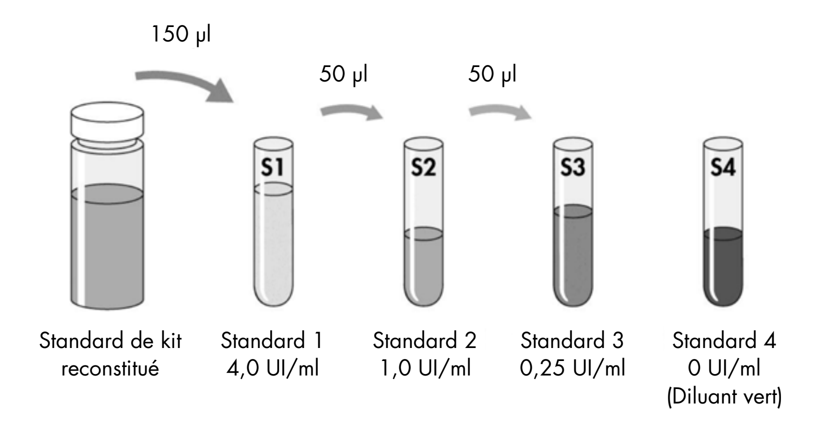


Figure 1. Préparation de la courbe de standard. Préparer des dilutions fraîches du standard de kit pour chaque session ELISA.

4. **Reconstituer le concentré de conjugué 100X lyophilisé avec 0,3 ml d'eau déionisée ou distillée. Mélanger doucement pour réduire la formation de mousse et pour garantir une solubilisation complète du conjugué.**

   Le conjugué concentré prêt à l'emploi est préparé en diluant la quantité requise de concentré de conjugué 100X dans le diluant vert comme indiqué dans le Tableau 1 - Préparation du conjugué.

Tableau 1. Préparation du conjugué.

Nombre de bandelettes	Volume du concentré de conjugué 100X	Volume de diluant vert
2	10 µl	1,0 ml
3	15 µl	1,5 ml
4	20 µl	2,0 ml
5	25 µl	2,5 ml
6	30 µl	3,0 ml
7	35 µl	3,5 ml
8	40 µl	4,0 ml
9	45 µl	4,5 ml
10	50 µl	5,0 ml
11	55 µl	5,5 ml
12	60 µl	6,0 ml

- Mélanger soigneusement mais doucement pour éviter la formation de mousse.
- Ramener tout concentré de conjugué 100X non utilisé de 2 °C à 8 °C immédiatement après emploi.
- Utiliser uniquement du diluant vert.

5. **Pour les échantillons de plasma prélevés dans les tubes de prélèvement sanguins puis congelés ou stockés pendant plus de 24 heures avant le test, mélanger soigneusement avant l'ajout au puits ELISA.**
   - Si les échantillons de plasma sont ajoutés directement depuis les tubes QFT centrifugés, tout mélange du plasma doit être évité.
6. **Ajouter 50 µl du conjugué concentré prêt à l'emploi fraîchement préparé dans les puits ELISA requis à l'aide d'une pipette multicanaux.**
7. **Ajouter 50 µl d'échantillons de plasma de test dans les puits appropriés à l'aide d'une pipette multicanaux (voir la configuration recommandée de microplaque pages 16 et 17, figures 2A et 2B). Enfin, ajouter 50 µl à chaque standard 1 à 4.**

	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
A	1N	1A	1M	*S1*	*S1*	*S1*	13N	13A	13M	21N	21A	21M
B	2N	2A	2M	*S2*	*S2*	*S2*	14N	14A	14M	22N	22A	22M
C	3N	3A	3M	*S3*	*S3*	*S3*	15N	15A	15M	23N	23A	23M
D	4N	4A	4M	*S4*	*S4*	*S4*	16N	16A	16M	24N	24A	24M
E	5N	5A	5M	9N	9A	9M	17N	17A	17M	25N	25A	25M
F	6N	6A	6M	10N	10A	10M	18N	18A	18M	26N	26A	26M
G	7N	7A	7M	11N	11A	11M	19N	19A	19M	27N	27A	27M
H	8N	8A	8M	12N	12A	12M	20N	20A	20M	28N	28A	28M

Figure 2A. Configuration d'échantillons recommandée pour les tubes de valeur zéro, antigène TB et mitogène (28 tests par microplaque).

- S1 (standard 1), S2 (standard 2), S3 (standard 3), S4 (standard 4)
- 1N (échantillon 1. plasma de valeur zéro), 1A (échantillon 1. plasma antigène TB), 1M (échantillon 1. plasma mitogène)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1N	5N	9N	13N	17N	*S1*	*S1*	25N	29N	33N	37N	41N
B	1A	5A	9A	13A	17A	*S2*	*S2*	25A	29A	33A	37A	41A
C	2N	6N	10N	14N	18N	*S3*	*S3*	26N	30N	34N	38N	42N
D	2A	6A	10A	14A	18A	*S4*	*S4*	26A	30A	34A	38A	42A
E	3N	7N	11N	15N	19N	21N	23N	27N	31N	35N	39N	43N
F	3A	7A	11A	15A	19A	21A	23A	27A	31A	35A	39A	43A
G	4N	8N	12N	16N	20N	22N	24N	28N	32N	36N	40N	44N
H	4A	8A	12A	16A	20A	22A	24A	28A	32A	36A	40A	44A

Figure 2B. Configuration d'échantillons recommandée pour les tubes de valeur zéro et antigène TB (44 tests par microplaque).

- S1 (standard 1), S2 (standard 2), S3 (standard 3), S4 (standard 4)
- 1N (échantillon 1. plasma de valeur zéro), 1A (échantillon 1. plasma antigène TB)

8. **Mélanger le conjugué et les échantillons/standards de plasma soigneusement en utilisant un agitateur de microplaque pendant 1 minute.**
9. **Couvrir chaque microplaque avec un couvercle et incuber à température ambiante (22 °C ± 5 °C) pendant 120 ± 5 minutes.**
   - Les microplaques ne doivent pas être exposées à la lumière directe du soleil pendant l'incubation.
10. **Au cours de l'incubation, diluer une mesure du concentré du tampon de lavage 20X avec 19 mesures d'eau déionisée ou distillée et mélanger soigneusement. Une quantité suffisante de concentré de tampon de lavage 20X est fournie pour préparer 2 litres de tampon de lavage concentré prêt à l'emploi.**

    Laver les puits avec **400 µl** de tampon de lavage concentré prêt à l'emploi pendant au moins 6 cycles. Un laveur de microplaque automatique est recommandé.
    - Il est essentiel de procéder soigneusement au lavage avant d'exécuter le test. Veiller à ce que chaque puits soit **complètement rempli** de tampon de lavage jusqu'en haut pour chaque cycle de lavage. Une période de trempage d'au moins 5 secondes est recommandée entre chaque cycle.
    - Un désinfectant de laboratoire standard doit être ajouté au réservoir d'effluent avant de suivre les procédures établies pour la décontamination de matériel potentiellement infectieux.
11. **Placer les microplaques face vers le bas sur une serviette absorbante sans peluche pour éliminer tout résidu de tampon de lavage. Ajouter 100 µl de solution de substrat d'enzyme dans chaque puits et mélanger soigneusement à l'aide d'un agitateur de microplaque.**
12. **Couvrir chaque microplaque avec un couvercle et incuber à température ambiante (22 °C ± 5 °C) pendant 30 minutes.**
    - Les microplaques ne doivent pas être exposées à la lumière directe du soleil pendant l'incubation.

13. **Après les 30 minutes d'incubation, ajouter 50 µl de solution de blocage d'enzyme à chaque puits et mélanger.**
    - La solution de blocage d'enzyme doit être ajoutée aux puits dans le même ordre et à environ la même vitesse que pour le substrat à l'étape 11.
14. **Mesurer la densité optique (DO) de chaque puits dans les 5 minutes de blocage de la réaction à l'aide d'un lecteur de microplaque équipé d'un filtre 450 nm et d'un filtre de référence de 620 nm à 650 nm. Les valeurs DO sont utilisées pour calculer les résultats.**

7. Calculs et interprétation du test

Le logiciel d'analyse QFT permet d'analyser les données brutes et de calculer les résultats. Il est disponible sur www.QuantiFERON.com. Veuillez vous assurer que vous utilisez la version la plus récente du logiciel.

Le logiciel effectue une évaluation de contrôle qualité du test, génère une courbe de standard et fournit un résultat de test pour chaque sujet, comme détaillé dans la section Interprétation des résultats.

En alternative à l'utilisation du logiciel d'analyse QFT, les résultats peuvent aussi être déterminés selon la méthode suivante.

Génération de la courbe de standard

(si le logiciel d'analyse QFT n'est pas utilisé)

Déterminer les valeurs DO moyennes des réplicats du standard du kit sur chaque microplaque.

Construire une courbe de standard $\log_{(e)}$-$\log_{(e)}$ en traçant le $\log_{(e)}$ de la DO moyenne (axe y) par rapport au $\log_{(e)}$ de la concentration IFN-γ des standards en UI/ml (axe x), en omettant le standard zéro dans ces calculs. Calculer la ligne de meilleur ajustement pour la courbe de standard par analyse de régression.

Utiliser la courbe de standard pour déterminer la concentration IFN-γ (UI/ml) de chacun des échantillons de plasma de test à l'aide de la valeur DO de chaque échantillon.

Ces calculs peuvent être effectués à l'aide des packs logiciels disponibles avec les lecteurs de microplaque ainsi qu'avec les tableurs standards ou logiciels statistiques (comme Microsoft® Excel®). Il est recommandé d'utiliser ces logiciels pour calculer l'analyse de régression, le coefficient de variation (%CV) pour les standards ainsi que le coefficient de corrélation (r) de la courbe de standard.

Contrôle qualité du test

L'exactitude des résultats du test dépend de l'exactitude de la génération de la courbe de standard. Ainsi, les résultats dérivés des standards doivent être examinés avant d'interpréter les résultats des échantillons du test.

Pour que le dosage ELISA soit valide :

- La valeur DO moyenne du standard 1 doit être ≥ 0,600.
- Le %CV des valeurs DO des réplicats du standard 1 et du standard 2 doit être ≤ 15 %.
- Les valeurs DO des réplicats pour les standards 3 et 4 ne doivent pas varier de plus de 0,040 unité de densité optique par rapport à leur moyenne.
- Le coefficient de corrélation (r) calculé à partir des valeurs d'absorbance moyennes des standards doit être ≥ 0,98.

Le logiciel d'analyse QFT calcule et rapporte ces paramètres de contrôle qualité.

Si les critères ci-dessus ne sont pas respectés, l'analyse est invalide et doit être répétée.

La valeur DO moyenne du standard zéro (diluant vert) doit être ≤ 0,150. Si la valeur DO moyenne est > 0,150, la procédure de lavage de microplaque doit être étudiée.

Interprétation des résultats

Les résultats QFT sont interprétés selon les critères suivants :

Remarque : le diagnostic ou l'exclusion de la tuberculose et l'évaluation de la probabilité de LTBI exige une combinaison de résultats épidémiologiques, historiques, médicaux et diagnostiques qui doivent être pris en compte dans l'interprétation des résultats QFT (tableaux 2 et 3).

Tableau 2. Utilisation des tubes de valeur zéro, antigène TB et mitogène.

Valeur zéro (UI/ml)	Antigène TB moins valeur zéro (UI/ml)	Mitogène moins valeur zéro (UI/ml)*	Résultat QFT	Rapport/interprétation
≤ 8,0	< 0,35	≥ 0,5	Négatif	Infection à *M. tuberculosis* improbable
	≥ 0,35 et < 25 % de la valeur zéro	≥ 0,5	Négatif	Infection à *M. tuberculosis* improbable
	≥ 0,35 et ≥ 25 % de la valeur zéro	Tous	Positif†	Infection à *M. tuberculosis* probable
	< 0,35	< 0,5	Indéterminé‡	Les résultats de la réponse des antigènes TB sont indéterminés
	≥ 0,35 et < 25 % de la valeur zéro	< 0,5	Indéterminé‡	Les résultats de la réponse des antigènes TB sont indéterminés
> 8,0§	Tous	Tous	Indéterminé‡	Les résultats de la réponse des antigènes TB sont indéterminés

* Les réponses au contrôle positif mitogène (et occasionnellement au contrôle antigène TB) peuvent souvent être situées en dehors de la plage du lecteur de microplaques. Cela n'a pas d'impact sur les résultats du test.

† Si l'infection par *M. tuberculosis* n'est pas suspectée, les résultats initialement positifs peuvent être confirmés en retestant les échantillons de plasma originaux en duplicats dans le dosage ELISA QFT. Si le test répété d'un ou de plusieurs réplicats est positif, l'individu doit être considéré comme positif au test.

‡ Voir la section « Dépannage » pour les causes possibles.

§ Dans les études cliniques, moins de 0,25 % des sujets présentaient des niveaux IFN-γ > 8,0 UI/ml pour la valeur zéro.

La magnitude du niveau IFN-γ mesuré ne peut pas être corrélée au stade ou au degré d'infection, au niveau de la réponse immunitaire ou à la probabilité pour la progression d'activer la maladie.

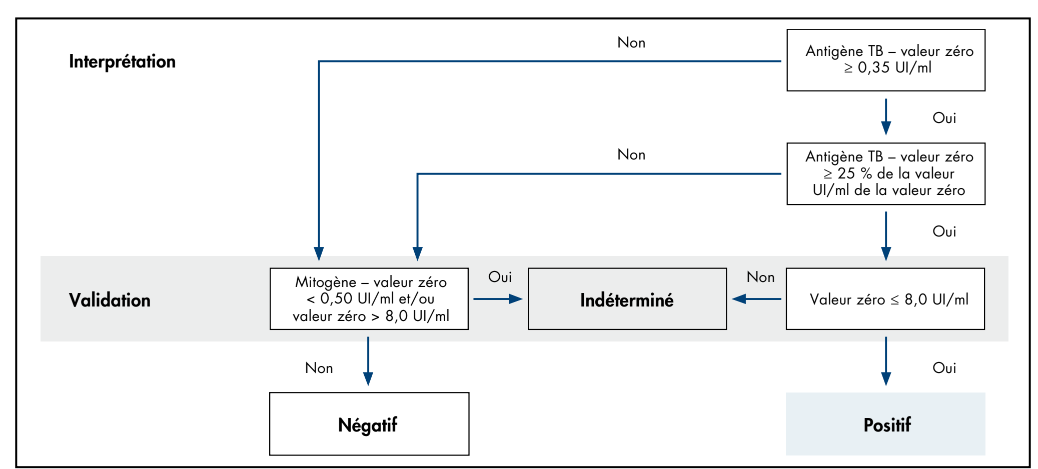


Figure 3. Organigramme d'interprétation lorsque les tubes de valeur zéro, antigène TB et mitogène sont utilisés.

Tableau 3. Lorsque seuls les tubes de valeur zéro et antigène TB QuantiFERON sont utilisés.

Valeur zéro (UI/ml)	Antigène TB moins valeur zéro (UI/ml)	Résultat QFT	Rapport/interprétation
≤ 8,0	< 0,35	Négatif	Infection à *M. tuberculosis* improbable
	≥ 0,35 et < 25 % de la valeur zéro	Négatif	Infection à *M. tuberculosis* improbable
	≥ 0,35 et ≥ 25 % de la valeur zéro	Positif*	Infection à *M. tuberculosis* probable
> 8,0†	Tous	Indéterminé‡	Les résultats de la réponse des antigènes TB sont indéterminés

* Si l'infection par *M. tuberculosis* n'est pas suspectée, les résultats initialement positifs peuvent être confirmés en retestant les échantillons de plasma originaux en duplicats dans le dosage ELISA QFT. Si le test répété d'un ou de plusieurs réplicats est positif, l'individu doit être considéré comme positif au test.

† Dans les études cliniques, moins de 0,25 % des sujets présentaient des niveaux IFN-γ > 8,0 UI/ml pour la valeur zéro.

‡ Voir la section « Dépannage » pour les causes possibles.

La magnitude du niveau IFN-γ mesuré ne peut pas être corrélée au stade ou au degré d'infection, au niveau de la réponse immunitaire ou à la probabilité pour la progression d'activer la maladie.

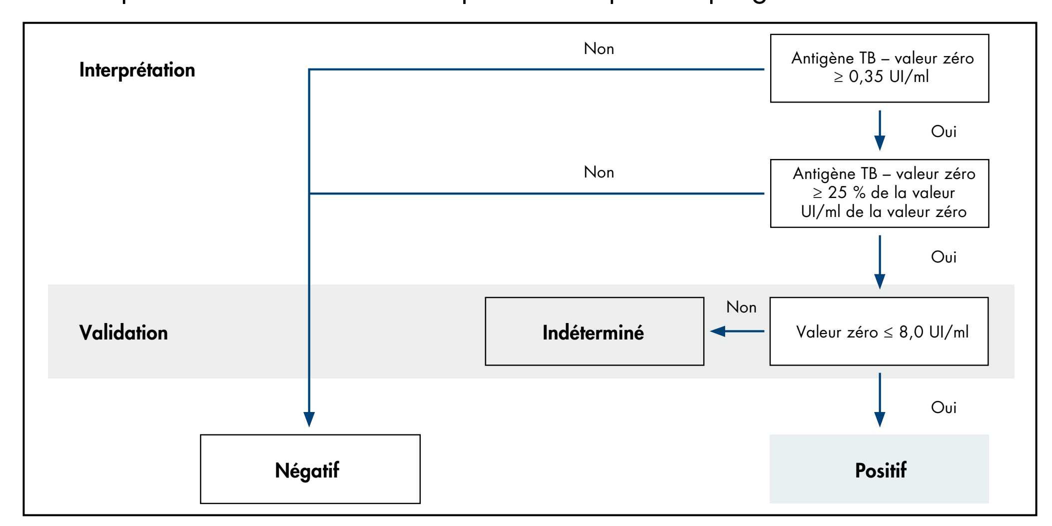


Figure 4. Organigramme d'interprétation lorsque seuls les tubes de valeur zéro et antigène TB QuantiFERON sont utilisés.

8. Limitations

Les résultats du test QFT doivent être utilisés en combinaison avec les antécédents épidémiologiques, le statut médical actuel et d'autres évaluations diagnostiques de chaque individu.

Les individus dont les valeurs zéro sont supérieures à 8 UI/ml sont considérés comme « indéterminés » car une réponse plus grande de 25 % aux antigènes TB peut se situer hors de la plage de mesure du test.

Les résultats non fiables ou indéterminés peuvent survenir dans les cas suivants :

- Déviations par rapport à la procédure décrite dans la *notice QuantiFERON-TB Gold (QFT) ELISA*
- Niveaux excessifs d'IFN-γ circulant ou présence d'anticorps hétérophiles
- Plus de 16 heures entre le prélèvement de l'échantillon sanguin et l'incubation à 37 °C

9. Caractéristiques des performances

Études cliniques

Comme il n'existe pas de standard définitif pour l'infection tuberculeuse latente (LTBI), une estimation de la sensibilité et de la spécificité pour QFT ne peut pas être évaluée sur le plan pratique. La spécificité de QFT a été approchée en évaluant les taux de faux positifs chez les personnes présentant un faible risque (pas de facteur de risque connu) de l'infection tuberculeuse. La sensibilité a été approchée en évaluant des groupes de patients souffrant de la tuberculose active confirmée en culture.

Spécificité

Dans une étude américaine portant sur 866 volontaires, du sang a été prélevé pour QFT lorsqu'un TCT était effectué. Les données démographiques et les facteurs de risque pour la tuberculose ont été déterminés à l'aide d'un sondage standard au moment du test. Sur les 432 volontaires sans facteur de risque connu pour l'infection par *M. tuberculosis*, 391 avaient des résultats QFT et TCT disponibles. Aucun n'était vacciné contre le BCG. Une seconde étude de spécificité a été effectuée avec le QFT chez des individus à faible risque au Japon, dont environ 90 % avaient reçu un vaccin BCG. Les résultats des 2 études de spécificité sont indiqués dans le tableau 4.

Tableau 4. Spécificité QFT : résultats des personnes sans risque connu d'infection par *M. tuberculosis*.

Étude	Statut BCG (% d'individus vaccinés)	Total d'individus testés	Nb de QFT indéterminés	Nb de QFT positifs / nb de tests valides	Spécificité QFT (IC 95 %)	Nb de TCT positifs / nb d'individus testés	Spécificité TCT* (IC 95 %)
États-Unis (non publié)	0 %	391	1	3/390	99,2 % (98–100)	6/391	98,5 % (97–99)
Japon (15)	~90 %	168	6	2/162	98,8 % (95–100)	–	–
Total	–	559	7/559 (1,3 %)	5/552	99,1 % (98–100)	–	–

* À l'aide d'un seuil TCT à 10 mm chez les individus non vaccinés contre le BCG. L'estimation de spécificité TCT est de 99,1 % avec un seuil à 15 mm.

Sensibilité pour la tuberculose active

Les individus des États-Unis, d'Australie et du Japon chez qui une tuberculose était suspectée et qui ont reçu la confirmation d'une infection par *M. tuberculosis* par culture ont été testés pour évaluer la sensibilité de QFT. S'il n'existe pas de test de standard définitif pour l'infection tuberculeuse latente (LTBI), la culture microbiologique de *M. tuberculosis* constitue un substitut adéquat, car les patients souffrant de la maladie sont par définition infectés. Les patients ont reçu moins de 8 jours de traitement avant le prélèvement sanguin pour le test QFT.

Le tableau 5 résume les résultats des trois groupes de patients positifs à *M. tuberculosis* par culture. La sensibilité générale du QFT pour la maladie tuberculeuse active était de 89 % (157/177).

Tableau 5. QFT : sujets avec infection par *M. tuberculosis* confirmée en culture.

Étude	Nb de QFT positifs / nb de tests valides	Sensibilité QFT (IC 95 %)
Patients TB japonais (15)	86/92	93 % (86–97 %)
Australiens	24/27	89 % (70–97 %)
Américains	47/58	81 % (68–90 %)
Total	157/177	89 % (83–93 %)

Diagnostic de la LTBI

Un certain nombre d'études ont été publiées pour démontrer la performance du QFT dans plusieurs populations présentant un risque de LTBI. Les principaux résultats de certaines études choisies sont indiqués dans le tableau 6.

Tableau 6. Études choisies publiées sur le QFT dans les populations présentant un risque de LTBI.

Étude	Total d'individus testés	Conclusions et résultats
Healthcare workers in India (Pai, et al 2005) (26)	726	Définition de taux TB très élevé. 40 % positifs QFT et 41 % positifs TCT à 10 mm. Haute concordance avec TCT, pas d'effet du BCG des deux côtés. Les deux tests étaient associés aux facteurs de risque que sont l'âge et la période de travail dans le secteur de la santé.
Danish HIV+ patients (Brock, et al 2006) (5)	590	La prévalence générale de la LTBI par QFT était de 4,6 % (27/590) chez les personnes VIH+. Les résultats positifs étaient associés aux risques TB. Deux sujets positifs QFT ont progressé vers la TB active en 1 an. Les réponses indéterminées (n=20, 3,4 %) étaient associées de manière significative à un compte CD4 < 100/µl.
Hospitalized children in India (Dogra, et al 2006) (10)	105	Les enfants chez qui la TB étaient suspectée ou qui présentaient des antécédents de contact avec la TB ont été testés avec QFT et TCT. 10,5 % étaient positifs au QFT et 9,5 % étaient positifs au TCT à 10 mm. La concordance entre les tests était de 95,2 % sur l'ensemble et de 100 % chez les enfants non vaccinés contre le BCG.
Contact investigations in Germany (Diel, et al 2006) (9)	309	Les contacts rapprochés de 15 cas différents ont été testés : 51 % étaient vaccinés contre le BCG, 27 % étaient nés à l'étranger ; 70 % des vaccinés contre le BCG et 18 % des non-vaccinés étaient positifs au TCT (5 mm) tandis que respectivement 9 % et 11 % étaient positifs au QFT. Le QFT était associé à un risque de TB. Le TCT était uniquement associé à la vaccination BCG.

De nombreuses autres publications décrivent la performance de la version antigène liquide moins sensible de QuantiFERON-TB Gold (précurseur de QFT) et du test QFT. Ces études incluent l'utilisation du ou des tests chez des contacts de cas de TB actifs (9, 11, 19, 25), des enfants (6–10, 25, 28), des patients VIH-positifs (2, 5, 20), des professionnels de la santé (13, 26, 32), des patients immunodéprimés (3, 4, 22, 23, 27, 30, 31), des patients chez qui la TB est suspectée (7, 8, 10, 18) et des individus à faible risque (15).

Répétabilité et effet du TCT sur le test QFT effectué ultérieurement

Dans le cadre de l'étude de spécificité des États-Unis, un sous-groupe de volontaires a été retesté entre 4 et 5 semaines après le test QFT et le TCT originaux. Les résultats QFT des 260 individus étaient disponibles aux deux moments et le niveau de concordance était de 99,6 % (259/260). Un TCT fait en premier n'induit pas de réponses QFT positives.

10. Informations techniques

Résultats indéterminés

Les résultats indéterminés doivent rester peu fréquents et peuvent être liés au statut immunologique de l'individu testé, mais aussi à un certain nombre de facteurs techniques :

- Plus de 16 heures entre le prélèvement sanguin et l'incubation à 37 °C
- Stockage du sang hors de l'intervalle de températures recommandé (de 17 °C à 27 °C)
- Mélange insuffisant des tubes de prélèvement sanguin
- Lavage incomplet de la microplaque ELISA

Si des problèmes techniques sont suspectés avec le prélèvement ou la manipulation des échantillons sanguins, répéter tout le test QFT avec un nouvel échantillon sanguin. Il est possible de répéter le test ELISA de plasmas stimulés si un lavage insuffisant ou une autre déviation de procédure avec le test ELISA sont suspectés. Les résultats indéterminés dus à des valeurs mitogènes faibles ou à des valeurs zéro élevées ne changeront pas si le test est répété, sauf en cas d'erreur avec le test ELISA. Les résultats indéterminés doivent être reportés tels quels. Les médecins peuvent choisir de prélever à nouveau un échantillon ou d'effectuer d'autres procédures s'ils le jugent nécessaire.

Échantillons de plasma coagulé

Si des caillots de fibrine apparaissent avec le stockage à long terme des échantillons de plasma, centrifuger les échantillons pour sédimenter la matière coagulée et faciliter le pipetage du plasma.

Guide de dépannage

Ce guide de dépannage peut vous aider à résoudre les problèmes qui pourraient se poser. Pour de plus amples informations, voir également les informations techniques fournies sur : www.QuantiFERON.com. Pour les coordonnées, voir la quatrième de couverture.

Dépannage ELISA

Développement de couleur non spécifique

Cause possible	**Solution**
a) Lavage incomplet de la microplaque	Laver la microplaque au moins 6 fois avec 400 µl/puits de tampon de lavage. Plus de 6 cycles de lavage peuvent être requis en fonction du laveur utilisé. Une période de trempage d'au moins 5 secondes doit être effectuée entre chaque cycle.
b) Contamination croisée des puits ELISA	Prendre garde lors du pipetage et du mélange des échantillons pour réduire les risques.
c) Kit/composants périmés	S'assurer que le kit est utilisé avant la date de péremption. S'assurer que le standard reconstitué et que le concentré de conjugué 100X sont utilisés dans les trois mois suivant la date de reconstitution.
d) Solution de substrat d'enzyme contaminée	Rejeter le substrat en cas de coloration bleue. S'assurer que les réservoirs de réactif sont propres.
e) Mélange du plasma dans les tubes QFT avant le prélèvement	Après la centrifugation, éviter le pipetage répété ou le mélange du plasma par d'autres moyens avant de le prélever. Prendre garde à ne pas perturber la matière sur la surface du gel, quelle que soit l'étape.

Lectures de faible densité optique pour les standards

Cause possible	**Solution**
a) Erreur de dilution du standard	S'assurer que les dilutions du standard de kit sont préparées correctement conformément à la notice QFT ELISA.
b) Erreur de pipetage	S'assurer que les pipettes sont calibrées et utilisées conformément aux instructions du fabricant.
c) Température d'incubation trop faible	L'incubation d'ELISA doit être effectuée à température ambiante (22 °C ± 5 °C).
d) Période d'incubation trop courte	L'incubation de la microplaque avec le conjugué, les standards et les échantillons doit être effectuée pendant 120 ± 5 minutes. La solution de substrat d'enzyme est incubée sur la microplaque pendant 30 minutes.
e) Mauvais filtre de lecteur de microplaque utilisé	La microplaque doit être lue à 450 nm avec un filtre de référence de 620 à 650 nm.
f) Les réactifs sont trop froids	Tous les réactifs, à l'exception du concentré de conjugué 100X, doivent être ramenés à température ambiante avant de commencer le test, ce qui prend environ une heure.

g) Kit/composants périmés	S'assurer que le kit est utilisé avant la date de péremption. S'assurer que le standard reconstitué et que le concentré de conjugué 100X sont utilisés dans les trois mois suivant la date de reconstitution.

Bruit de fond élevé

Cause possible	**Solution**
a) Lavage incomplet de la microplaque	Laver la microplaque au moins 6 fois avec 400 µl/puits de tampon de lavage. Plus de 6 cycles de lavage peuvent être requis en fonction du laveur utilisé. Une période de trempage d'au moins 5 secondes doit être effectuée entre chaque cycle.
b) Température d'incubation trop élevée	L'incubation d'ELISA doit être effectuée à température ambiante (22 °C ± 5 °C).
c) Kit/composants périmés	S'assurer que le kit est utilisé avant la date de péremption. S'assurer que le standard reconstitué et que le concentré de conjugué 100X sont utilisés dans les trois mois suivant la date de reconstitution.
d) Solution de substrat d'enzyme contaminée	Rejeter le substrat en cas de coloration bleue. S'assurer que les réservoirs de réactif sont propres.

Courbe de standard non linéaire et variabilité des duplicats

Cause possible	**Solution**
a) Lavage incomplet de la microplaque	Laver la microplaque au moins 6 fois avec 400 µl/puits de tampon de lavage. Plus de 6 cycles de lavage peuvent être requis en fonction du laveur utilisé. Une période de trempage d'au moins 5 secondes doit être effectuée entre chaque cycle.
b) Erreur de dilution du standard	S'assurer que les dilutions du standard sont préparées correctement conformément à la notice QFT ELISA.
c) Mélange insuffisant	Mélanger soigneusement les réactifs par inversion ou en les vortexant doucement avant de les ajouter à la microplaque.
d) Technique de pipetage incohérente ou interruption pendant la mise en place du test	L'ajout des échantillons et des standards doit être effectué de manière continue. Tous les réactifs doivent être préparés avant de commencer le test.

Une vidéo de procédure du test et des solutions à la plupart des problèmes techniques sont disponibles sur Gnowee™ en s'inscrivant directement sur www.gnowee.net pour un accès en ligne. Les informations produit et les guides techniques sont disponibles gratuitement auprès de QIAGEN, via votre distributeur ou sur le site www.QuantiFERON.com.

11. Bibliographie

Une liste complète de références QFT est disponible sur Gnowee, la bibliothèque de référence QuantiFERON, accessible sur www.gnowee.net.

1. Andersen, P. et al. (2000) Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. Lancet **356**, 1099.
2. Balcells, M.E. et al. (2008) A comparative study of two different methods for the detection of latent tuberculosis in HIV-positive individuals in Chile. Int. J. Infect. Dis. **12**, 645.
3. Bartalesi, F. et al. (2009) QuantiFERON-TB Gold and TST are both useful for latent TB screening in autoimmune diseases. Eur. Respir. J. **33**, 586.
4. Bocchino, M. et al. (2008) Performance of two commercial blood IFN-gamma release assays for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection in patient candidates for anti-TNF-alpha treatment. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **27**,907.
5. Brock, I. et al. (2006) Latent tuberculosis in HIV positive, diagnosed by the *M. tuberculosis* specific interferon-gamma test. Respir. Res. **7**, 56.
6. Chun, J.K. et al. (2008) The role of a whole blood interferon gamma assay for the detection of latent tuberculosis infection in bacille Calmette-Guerin vaccinated children. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **62**, 389.
7. Connell, T.G. et al. (2008) A three-way comparison of tuberculin skin testing, QuantiFERON-TB gold and T-SPOT.TB in children. PLoS ONE **3**, e2624. doi: 10.1371/journal.pone.0002624.
8. Detjen, A.K. et al. (2007) Interferon-gamma release assays improve the diagnosis of tuberculosis and nontuberculous mycobacterial disease in children in a country with a low incidence of tuberculosis. Clin. Infect. Dis. **45**, 322.
9. Diel, R. et al. (2009) Comparative performance of tuberculin skin test, QuantiFERON-TB-Gold In-Tube assay, and T-Spot.TB test in contact investigations for tuberculosis. Chest **135**, 1010.
10. Diel, R. et al. (2008) Predictive value of a whole-blood IFN-γ assay for the development of active TB disease. Am. J. Respir. Crit. Care Med. **177**, 1164.
11. Diel, R. et al. (2006) Tuberculosis contact investigation with a new, specific blood test in a low-incidence population containing a high proportion of BCG-vaccinated persons. Respir. Res. **7**, 77.
12. Dogra, S. et al. (2007) Comparison of a whole blood interferon-gamma assay with tuberculin skin testing for the detection of tuberculosis infection in hospitalized children in rural India. J. Infect. **54**, 267.
13. Drobniewski, F. et al. (2007) Rates of latent tuberculosis in health care staff in Russia. PLoS Med. **4**, e55.
14. Gerogianni, I. et al. (2008) Whole-blood interferon-gamma assay for the diagnosis of tuberculosis infection in an unselected Greek population. Respirology **13**, 270.
15. Harada, N. et al. (2008) Comparison of the sensitivity and specificity of two whole blood interferon-gamma assays for *M. tuberculosis* infection. J. Infect. **56**, 348.
16. Higuchi, K. et al. (2009) Comparison of performance in two diagnostic methods for tuberculosis infection. Med. Microbiol. Immunol. **198**, 33.
17. Kang, Y.A. et al. (2005) Discrepancy between the tuberculin skin test and the whole-blood interferon gamma assay for the diagnosis of latent tuberculosis infection in an intermediate tuberculosis-burden country. JAMA **293**, 2756.
18. Katiyar, S.K. et al. (2008) Use of the QuantiFERON-TB Gold In-Tube test to monitor treatment efficacy in active pulmonary tuberculosis. Int. J. Tuberc. Lung Dis. **12**, 1146.

19. Kipfer, B. et al. (2008) Tuberculosis in a Swiss army training camp: contact investigation using an Interferon gamma release assay. Swiss. Med. Wkly. **138**, 267.

20. Luetkemeyer, A. et al. (2007) Comparison of an interferon-gamma release assay with tuberculin skin testing in HIV-infected individuals. Am. J. Respir. Crit. Care Med. **175**, 737.

21. Mackensen, F. et al. (2008) QuantiFERON TB-Gold - A new test strengthening long-suspected tuberculous involvement in serpiginous-like choroiditis. Am. J. Ophthalmol. **146**, 761.

22. Manuel, O. et al. (2007) Comparison of Quantiferon-TB Gold with tuberculin skin test for detecting latent tuberculosis infection prior to liver transplantation. Am. J. Transplant. **7**, 2797.

23. Matulis, G. et al. (2007) Detection of latent tuberculosis in immunosuppressed patients with autoimmune diseases performance of a *Mycobacterium tuberculosis* antigen specific IFN-gamma assay. Ann. Rheum. Dis. **67**, 84.

24. Mirtskhulava, V. et al. (2008) Prevalence and risk factors for latent tuberculosis infection among health care workers in Georgia. Int. J. Tuberc. Lung Dis. **12**, 513.

25. Nakaoka, H. et al. (2006) Risk for tuberculosis among children. Emerging Infect. Dis. **12**, 1383.

26. Pai, M. et al. (2005) Mycobacterium tuberculosis infection in health care workers in rural India: comparison of a whole-blood, interferon-g assay with tuberculin skin testing. JAMA **293**, 2746.

27. Ponce de Leon, D. et al. (2008) Comparison of an interferon-gamma assay with tuberculin skin testing for detection of tuberculosis (TB) infection in patients with rheumatoid arthritis in a TB-endemic population. J Rheumatol. **35**, 776.

28. Richeldi, L. et al. (2008) Prior tuberculin skin testing does not boost QuantiFERON-TB results in paediatric contacts. Eur. Respir. J. **32**, 524.

29. Rothel, J.S. and Andersen, P. (2005) Diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection: is the demise of the Mantoux test imminent? Expert Rev. Anti Infect. Ther. **3**, 981.

30. Schoepfer, A.M. et al. (2008) Comparison of interferon-gamma release assay versus tuberculin skin test for tuberculosis screening in inflammatory bowel disease. Am. J. Gastroenterol. **103**, 2799.

31. Silverman, M.S. et al. (2007) Use of an interferon-gamma based assay to assess bladder cancer patients treated with intravesical BCG and exposed to tuberculosis. Clin. Biochem. **40**, 913.

32. Stebler, A. et al. (2008) Whole-blood interferon-gamma release assay for baseline tuberculosis screening of healthcare workers at a Swiss university hospital. Infect. Control Hosp. Epidemiol. **29**, 681.

12. Service technique

Pour le service technique, merci de contacter :

www.QuantiFERON.com

Asia-Pacific ▪ techservice-ap@qiagen.com

Europe ▪ techserviceQFT-eu@qiagen.com

Middle East/Africa ▪ techserviceQFT-eu@qiagen.com

USA/Canada ▪ techservice-na@qiagen.com

Latin America (not including Brazil or Mexico) ▪ techservice-latam@qiagen.com

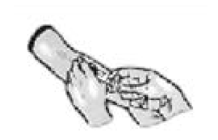
Mexico ▪ techservice-MX@qiagen.com

Brazil ▪ techsebr@qiagen.com

13. Résumé de la procédure du test

Étape 1 — Incubation du sang

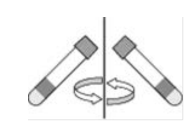
1. Prélever le sang du patient dans les tubes de prélèvement sanguin et les mélanger en les secouant dix (10) fois suffisamment fort pour s'assurer que toute la paroi interne du tube est tapissée de sang, et ce, afin de dissoudre les antigènes présents sur les parois du tube.



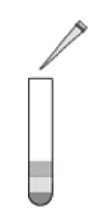
2. Incuber les tubes debout à 37 °C ± 1 °C pendant 16 à 24 heures.



3. Après l'incubation, centrifuger les tubes pendant 15 minutes de 2 000 à 3 000 FCR (g) pour séparer le plasma et les globules rouges.



4. Après la centrifugation, éviter le pipetage répété ou le mélange du plasma par d'autres moyens avant de le prélever. Prendre garde à ne pas perturber la matière sur la surface du gel, quelle que soit l'étape.

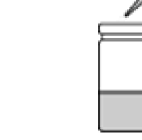


Étape 2 — IFN-γ ELISA

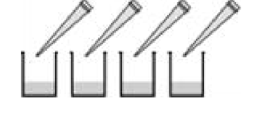
1. Ramener les composants ELISA, à l'exception du concentré de conjugué 100X, à température ambiante (22 °C ± 5 °C) pendant au moins 60 minutes.



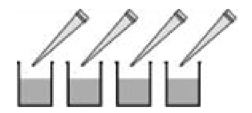
2. Reconstituer le standard du kit à 8,0 UI/ml avec de l'eau distillée ou déionisée. Préparer quatre (4) dilutions de standard.
3. Reconstituer le concentré de conjugué 100X lyophilisé avec de l'eau distillée ou déionisée.



4. Préparer le conjugué concentré prêt à l'emploi dans le diluant vert et ajouter 50 µl dans tous les puits.



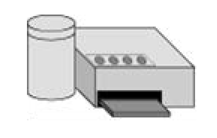
5. Ajouter 50 µl d'échantillons de plasma test et 50 µl de standards dans les puits correspondants. Mélanger avec l'agitateur.



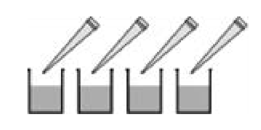
6. Incuber pendant 120 ± 5 minutes à température ambiante.



7. Laver les puits au moins 6 fois avec 400 µl/puits de tampon de lavage.



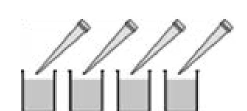
8. Ajouter 100 µl de solution de substrat d'enzyme aux puits. Mélanger avec l'agitateur.



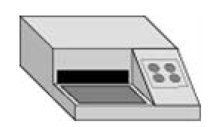
9. Incuber pendant 30 minutes à température ambiante.



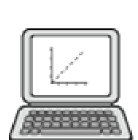
10. Ajouter 50 µl de solution de blocage d'enzyme aux puits. Mélanger avec l'agitateur.



11. Lire les résultats à 450 nm avec un filtre de référence de 620 à 650 nm.



12. Analyser les résultats.



Changements significatifs

Les changements significatifs de cette édition (1075115FR Rév. 01) de la notice QFT ELISA sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Section	Page	Changement(s)
4. Avertissements et précautions	8–10	Amendement à l'utilisation de certains composants ELISA entre les lots de kit.
12. Service technique	29	Nouvelle adresse e-mail du service technique.

Notes

Marques déposées : QIAGEN®, QFT®, QuantiFERON® (groupe QIAGEN) ; Microsoft®, Excel® (Microsoft) ; ProClin® (Rohm and Haas Co.).

Accord de licence limité pour QuantiFERON-TB Gold (QFT) ELISA

En utilisant ce produit, l'acheteur ou l'utilisateur accepte les conditions suivantes :

1. Le produit ne doit être utilisé que conformément aux protocoles fournis et à cette notice et uniquement avec les composants contenus dans ce kit. QIAGEN n'accorde aucune licence sous sa propriété intellectuelle pour utiliser ou intégrer les composants fournis dans ce kit avec tout autre composant non fourni dans ce kit, à l'exception de ce qui est stipulé dans les protocoles fournis avec le produit et cette notice.
2. En dehors des licences énoncées expressément, QIAGEN n'offre aucune garantie indiquant que ce kit et/ou son ou ses utilisations ne violent pas les droits de tiers.
3. Ce kit et ses composants sont sous licence pour une utilisation unique et ne peuvent pas être réutilisés, remis à neuf ou revendus, sauf mention contraire de QIAGEN.
4. QIAGEN rejette notamment toutes les autres licences, expresses ou tacites, autres que celles énoncées expressément.
5. L'acheteur et l'utilisateur du kit consentent à ne pas prendre, ni autoriser quiconque à prendre, de quelconques mesures pouvant entraîner ou faciliter la réalisation d'actes interdits par les conditions précédentes. QIAGEN peut faire appliquer les interdictions de cet Accord de licence limitée par tout tribunal et pourra recouvrir tous ses frais de recherche et de justice, y compris les frais d'avocats, en cas d'action en application de cet Accord de licence limitée ou de tous ses droits de propriété intellectuelle liés au kit et/ou à ses composants.

Pour consulter les mises à jour de la licence, voir www.qiagen.com.

Phone: (Australia) +613-9840-9800

E-mail: quantiferon@qiagen.com

